

УДК 543.544.865

МЕТРОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА РАСТИТЕЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ И ГИДРОЛИЗАТОВ БЕЛКОВ НА СОДЕРЖАНИЕ АМИНОКИСЛОТ МЕТОДОМ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ НА ИОНООБМЕННЫХ СМОЛАХ

Е.В.Ванчикова, Б.М.Кондратенко*, Л.Р.Зубкова*, Н.А.Жук

Сыктывкарский государственный университет

167001, Сыктывкар, Октябрьский пр., 55

*Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН

167982, Сыктывкар, ГСП-2, Коммунистическая, 28

kondratenok@ib.komisc.ru

Поступила в редакцию 19 декабря 2003 г.

Оценены характеристики погрешности измерения содержания аминокислот в растительных образцах и гидролизатах белков. Выявлены зависимости их значений от различных факторов.

Ванчикова Евгения Валентиновна – кандидат химических наук, заведующая кафедрой физической химии Сыктывкарского государственного университета.

Область научных интересов: метрологическое исследование методик количественного химического анализа объектов окружающей среды.

Кондратенко Борис Михайлович – кандидат химических наук, заведующий лабораторией “Экоаналит” Института биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН.

Область научных интересов: аналитическая химия окружающей среды; мониторинг объектов окружающей среды; исследование органического вещества почв.

Зубкова Людмила Руслановна – ведущий инженер-химик Института биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН.

Область научных интересов: количественный химический анализ растительных образцов и гидролизатов белков на содержание аминокислот.

Жук Надежда Алексеевна – студентка 5 курса Сыктывкарского государственного университета.

Метод определения доступного лизина в кормах, содержащих белки животного или растительного происхождения, устанавливает стандарт [1], цистина и метионина – [2]. Стандарта, устанавливающего метод комплексного определения аминокислот в растительных объектах, в настоящее время не существует. Поэтому целью данной работы является подготовка к аттестации методики анализа растительных образцов и гидролизатов белков на содержание семнадцати аминокислот методом жидкостной хроматографии на ионообменных смолах.

Метод измерения содержания аминокислот в образцах растительных объектов

Образцы растительных объектов содержат белки, которые при гидролизе распадаются на аминокислоты: аспаргиновую, треонин, серин, глутаминовую, пролин, цистин, глицин, аланин, валин, метионин, изолейцин, лейцин, тирозин, фенилаланин, гистидин, лизин, аргинин и др. Разделение смеси аминокислот осуществляют на хроматографической колонке, заполненной ионообменной смолой “Ostion”. Последовательность выхода из колонки отдельных компонентов смеси зависит от сродства аминокислот к иониту, свойств ионита, температуры системы и состава элюента – буферного раствора переменного состава.

Детектирование компонентов в элюате осуществляют фотометрически по поглощению на дли-

не волны $\lambda = 520$ нм окрашенного в желтый цвет соединения, образующегося в результате постколочной реакции аминокислоты с нингидрином. Хроматограмма аминокислот, полученная на анализаторе ААА 339 с использованием буферных растворов с рН, равным 2,90, 4,25 и 7,90, приведена на рис. 1. Молярную концентрацию аминокислот в гидролизате белков измеряют методом сравнения интегральных интенсивностей хроматографических пиков, полученных для исследуемого раствора и аттестованной смеси, в которой содержание каждой из аминокислот соответствует середине исследуемого концентрационного диапазона.

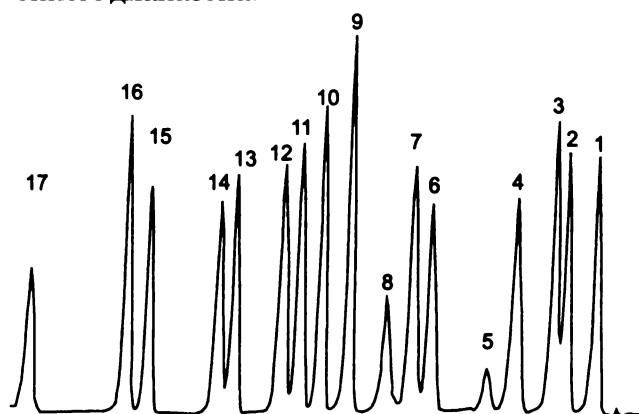


Рис.1. Хроматограмма водного раствора смеси аминокислот, в котором молярная концентрация каждой кислоты равна $(0,500 \pm 0,010)$ мкмоль/см³. Нумерация пиков соответствует номерам аминокислот в табл. 1

Количественный химический анализ гидролизатов белков

Причины погрешности определения содержания аминокислот, связанные непосредственно с хроматографическим методом анализа, были выявлены с использованием модельных гидролизатов белков – водных растворов аминокислот.

Из реактивов, высушенных при температуре $(80,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ до постоянной массы, приготовили солянокислый раствор, в котором молярная концентрация каждой из аминокислот равна $(2,500 \pm 0,008)$ мкмоль/см³. Путем разбавления исходного раствора аминокислот лимоннокислым буферным раствором получили пять аттестованных смесей, в которых молярная концентрация каждой из аминокислот соответствовала диапазону от 0,15 до 1 мкмоль/см³ включительно, и провели их анализ в условиях внутрилабораторной воспроизводимости не менее 17 раз.

Выборки измеренных значений молярных концентраций аминокислот в растворах были подвергнуты анализу на промахи, нормальность распределения, стохастическую зависимость. По алгоритму, предложенному в [3, 4], оценены характеристики погрешности: среднее квадратичное отклонение случайной составляющей погрешности; границы симметричных интервалов, в которых систематическая составляющая и результирующая погрешности находятся с вероятностью $P = 0,95$.

Для методики измерения содержания аминокислот в гидролизатах белков значимы значения обеих составляющих результирующей погрешности: случайной и систематической.

Среднее квадратичное отклонение случайной составляющей абсолютной погрешности $\sigma(\Delta)$ имеет мультипликативный характер (рис.2). Следовательно, методике измерения молярной концентрации аминокислот в гидролизатах белков можно приписать для каждого компонента одно значение среднего квадратичного отклонения случайной составляющей относительной погрешности $\sigma(\delta)$ для всего исследованного концентрационного диапазона.

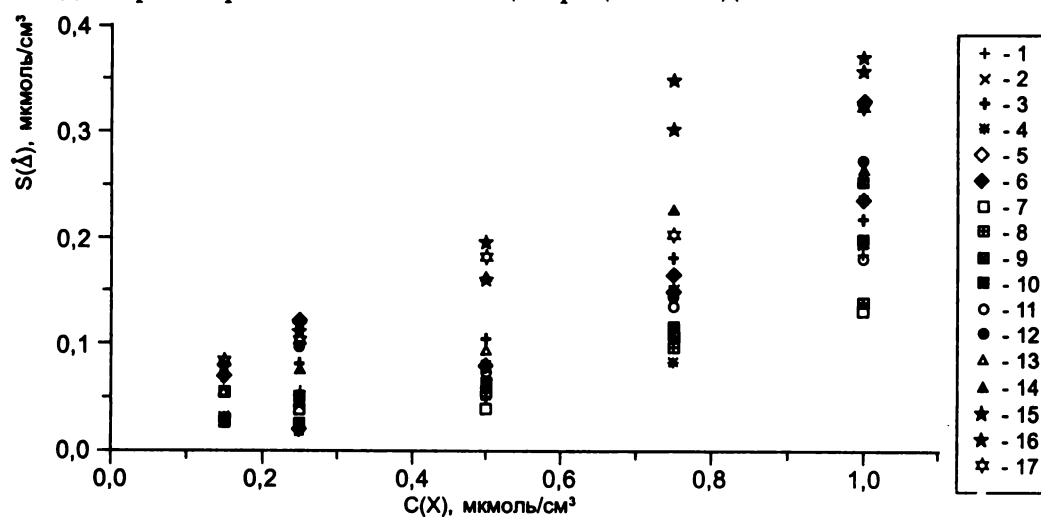


Рис.2. Зависимость среднего квадратичного отклонения случайной составляющей абсолютной погрешности от молярной концентрации аминокислот в гидролизатах белков. Нумерация кривых соответствует номерам аминокислот в табл.1

Характеристики случайной составляющей погрешности измерения содержания аминокислот в гидролизатах белков зависят от времени удерживания компонентов в хроматографической колонке и от чувствительности фотометрической реакции аминокислоты с нингидрином, характеризующейся молярным коэффициентом погашения.

Для первой группы компонентов: аспаргиновой кислоты, треонина, серина, глутаминовой кислоты, глицина, аланина, валина, метионина, изолейцина $\sigma(\delta) = 4\%$; для второй группы: лейцина, тирозина, фенилаланина – 6% ; для трех последних: гистидина, лизина, аргинина – 8% . Только для пролина и цистина значения $\sigma(\delta)$ (11 и 7% , соответственно) не подчиняются данной закономерности. Это связано с их низкой устойчи-

тью и плохим разрешением хроматографических пиков, что приводит к уменьшению значения молярного коэффициента погашения и увеличению характеристики случайной составляющей относительной погрешности.

При оценке систематической составляющей погрешности учитывали правильность градуировки хроматографа и погрешности операций приготовления аттестованных смесей. Наименьшее отклонение результата анализа от аттестованного значения содержания аминокислот в растворах наблюдается в центре исследованного диапазона, вблизи реперного значения. По мере удаления от данной точки математическое ожидание систематической составляющей абсолютной погрешности возрастает более чем в 10 раз (рис. 3).

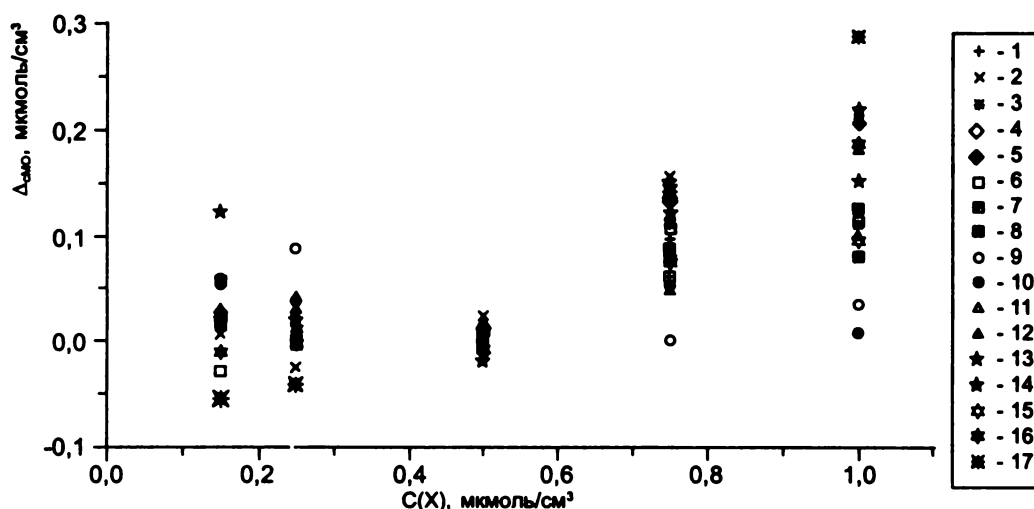


Рис. 3. Зависимость математического ожидания систематической составляющей абсолютной погрешности от молярной концентрации аминокислот в гидролизатах белков. Нумерация кривых соответствует номерам аминокислот в табл.1

Выбор реперного значения молярной концентрации аминокислот при анализе гидролизатов белков влияет и на характеристики результирующей погрешности (рис. 4). Однако для измеренных значений содержания аминокислот в четырех аттестованных смесях (исключая смесь, в которой молярная концентрация аминокислоты соответствует реперному значению $C(X) = 0,5$ мкмоль/дм³) дисперсии однородны, и, следовательно, их можно усреднить, приписав для каждой кислоты одно значение характеристики относительной погрешности всему концентрационному диапазону.

Количественный химический анализ стандартных растительных образцов

Методика количественного химического анализа растительных образцов на содержание аминокислот включает дополнительную стадию – гидролиз белков в растворе хлороводородной кис-

лоты при нагревании в запаянных ампулах. Вклад процедуры гидролиза белков в погрешность измерения содержания аминокислот в растительных образцах оценивали по результатам количественного химического анализа двух стандартных образцов: состава злаковой травосмеси (СО № 1) и клубней картофеля (СО № 2) на содержание 17 аминокислот в условиях внутрилабораторной воспроизводимости 23 раза.

Содержание исследуемых аминокислот в стандартных образцах варьирует от $0,05\%$ для цистина до $2,42\%$ для глутаминовой кислоты (см. таблицу). Так как анализ образца проводят одновременно на содержание всех компонентов, навески выбраны таким образом, чтобы в гидролизате молярная концентрация большинства аминокислот соответствовала исследованному ранее диапазону: $m_1 = 50$ мг, $m_2 = 100$ мг для СО № 1 и № 2 соответственно. Объем буферного лимон-

нокислого раствора, в котором растворили сухую смесь аминокислот, полученную после выпари-

вания гидролизата растительных белков, составляет 5,00 см³.

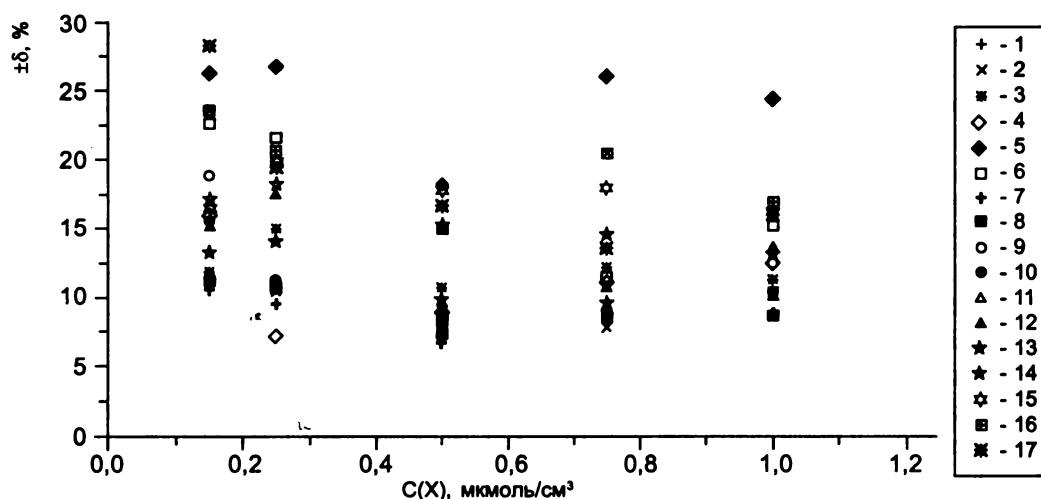


Рис. 4. Зависимость значений границ симметричного интервала, в котором относительная погрешность находится с вероятностью $P=0.95$, от молярной концентрации аминокислот в гидролизатах белков. Нумерация кривых соответствует номерам аминокислот в табл.1

Для устойчивых к нагреванию компонентов (аспаргиновой кислоты, треонина, серина, глицина, аланина и валина) характеристика погрешности измерения их содержания в растительных образцах увеличилась не более чем на 4 %, а лейцина и лизина – на 8 % по сравнению с мето-

дикой анализа водных растворов. Для менее стабильных аминокислот (тирозина, фенилаланина, гистидина, аргинина) характеристика погрешности измерения их содержания увеличилась более чем на 20 %.

Таблица 1

Метрологические характеристики стандартных образцов состава злаковой травосмеси (СО №1) и клубней картофеля (СО №2)

Но- мер	Аминокислота	Молярный коэффициент погашения, $K \cdot 10^{-4}$ см ³ /ммоль	Значения массовых долей аминокислот в стандартных образцах $w(X)$ и их характеристики погрешности* $\pm \Delta$, %							
			СО №1				СО №2			
			опорные		измеренные		опорные		измеренные	
			$w(X)$	$\pm \Delta$	$w(X)$	$\pm \Delta$	$w(X)$	$\pm \Delta$	$w(X)$	$\pm \Delta$
1	Аспарагиновая	3,18	1,71	0,10	1,72	0,19	1,34	0,07	1,37	0,12
2	Треонин	3,18	0,83	0,08	0,83	0,10	0,27	0,02	0,26	0,03
3	Серин	3,43	0,76	0,07	0,77	0,09	0,27	0,03	0,25	0,03
4	Глутаминовая	3,52	2,15	0,24	2,4	0,4	1,13	0,16	1,30	0,26
5	Пролин	0,53	0,85	0,13	0,80	0,23	0,24	0,02	0,24	0,10
6	Глицин	3,25	0,93	0,09	1,01	0,13	0,24	0,03	0,23	0,03
7	Аланин	3,48	1,28	0,15	1,29	0,15	0,29	0,07	0,28	0,03
8	Цистин	1,93	0,05	0,00	0	-	0,05	0,00	0	-
9	Валин	3,60	0,92	0,12	0,95	0,14	0,37	0,05	0,36	0,05
10	Метионин	3,41	0,23	0,02	0,01	0,02	0,06	0,01	0,02	0,03
11	Изолейцин	3,34	0,74	0,09	0,64	0,19	0,24	0,05	0,23	0,05
12	Лейцин	3,38	1,43	0,13	1,6	0,3	0,42	0,04	0,42	0,08
13	Тирозин	3,02	0,58	0,07	0,7	0,4	0,23	0,03	0,66	0,26
14	Фенилаланин	3,00	0,94	0,09	0,94	0,28	0,30	0,03	0,23	0,12
15	Гистидин	3,24	0,46	0,05	0,31	0,07	0,13	0,02	0,09	0,04
16	Лизин	3,72	1,06	0,11	0,85	0,23	0,39	0,04	0,34	0,08
17	Аргинин	2,82	0,96	0,09	0,9	0,4	0,37	0,06	0,35	0,14

* Границы интервала, в котором погрешность измерения массовой доли аминокислоты в образце находится с вероятностью $P = 0.95$.

Следует уделить особое внимание результатам анализа растительных образцов на содержание серусодержащих аминокислот: цистина и метионина. Во-первых, их содержание в растительных образцах мало по сравнению с другими аминокислотами, и при одновременном проведении анализа на содержание всех компонентов их молярная концентрация в гидролизатах оказывается вблизи или за пределами нижней границы исследованного концентрационного диапазона. Во-вторых, цистин входит в состав многих природных белков, но не включается в пептидную цепь непосредственно, а образует дисульфидные

связи, которые легко разрушаются в кислой среде при нагревании. Метионин также нестабилен и переходит в метионинсульфоксид или в более жестких условиях – в метионинсульфат. Следовательно, данный метод гидролиза растительных белков для цистина и метионина не применим.

Методика выполнения измерений содержания аминокислот в гидролизатах белков и растительных образцах методом жидкостной хроматографии на ионообменных смолах аттестована в соответствии с ГОСТ Р 8.563 Центром метрологии и сертификации Президиума Уральского отделения Российской академии наук – Центром "Сертимет".

ЛИТЕРАТУРА

1. ГОСТ 51416-99. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Определение массовой доли доступного лизина.
2. ГОСТ 13496.22-90. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Метод определения цистина и метионина.
3. К.Ж. Дерффель. Статистика в аналитической химии. М.: Мир, 1994. 268 с.
4. Е.В.Ванчикова. Алгоритм оценки метрологических характеристик методик количественного химического анализа с использованием стандартных образцов (аттестованных образцов, аттестованных смесей). Сыктывкар: Изд-во Коми НЦ УрО РАН, 2001. 63 с.

* * * * *

METROLOGICAL RESEARCH OF THE SYSTEM OF QUANTITATIVE CHEMICAL ANALYSIS OF PLANT SPECIMENT AND HYDROLYSATES OF PROTEINS ON CONTENT OF AMINO ACIDS BY THE METHOD OF LIQUID CHROMATOGRAPHY ON THE ION-EXCHANGE RESINS

E. V.Vanchikova, B.M.Kondratenok, L.R.Zubkova, N.A.Zhuk

The characteristics of a measuring error of the content of amino acids in plant samples and hydrolysates of proteins were rated. The associations of their values from the different factors were found out.